Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg
Physiologisch-chemische Abteilung.
Vorstand: Professor Dr. med. et phil. h. c. Fr. Kutscher

Physiologisch-chemische Untersuchung eines insulinfreien Pankreasextraktes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität Marburg

vorgelegt von

Wilhelm Spahr

approbierter Arzt aus Marburg.

1936

Buchdruckerei Richard Mayr, Würzburg

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am
21. September 1934.

Referent: Professor Dr. med. et phil. h. c. Fr. Kutscher.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Physiologisch-chemische Untersuchung eines insulinfreien Pankreasextraktes.

In letzter Zeit hat die Bauchspeicheldrüse größtes Interesse gewonnen, weil man aus ihr, abgesehen von bereits bekannten Sekretstoffen, ein überaus wichtiges Inkret, das Insulin hat darstellen können, das zur Regulierung des Kohlehydratstoffwechsels große Bedeutung besitzt.

Für mich gab dies den Anstoß zu weiteren Untersuchungen über das Vorkommen von Inkretstoffen im Pankreas, die vielleicht wie das Insulin ebenfalls den Kohlehydratstoffwechsel beeinflussen können. Frühere Arbeiten schienen mir einen Anhalt dazu zu geben.

Vor längerer Zeit sind von Kutscher und Otori (1) bei der Selbstverdauung des Pankreas mehrfach größere Mengen von Guanidin gefunden worden. Dieser auffällige Befund steht einzeln da bei Selbstverdauung oder hydrolytischer Aufspaltung anderer Organe. Niemals wurde Guanidin nachgewiesen.

Nur bei Oxydation der Eiweißkörper mit Permanganaten erhielt man Guanidin (2), das aus Arginin resp. aus anderen Muttersubstanzen, die einen Guanidinkern enthalten, hervorgegangen war und das sich so fest gegen Oxydation mit Permanganaten verhielt, daß man es benutzen konnte, um das Arginin, das in den Eiweißkörpern als Baustein drin steckte festzustellen und zu errechnen, ob sich neben dem Arginin noch andere Bausteine im Eiweiß befinden, die Guanidin enthalten.

So zeigt sich bei der Säurespaltung von Pseudomucin (3), nachdem das Arginin rein gewonnen wurde, eine geringere Ausbeute an guanidinhaltigen Substanzen, als wenn man das Pseudomucin der Oxydation mit Permanganaten unterwarf.

Ebenso lieferte die Oxydation von Nukleinsäuren mit Permanganaten Guanidin (4). Die Muttersubstanz ist hier Guanin. Diese Feststellung ist hier deshalb von Wichtigkeit, weil gerade das Pankreas reich an Guanylsäure ist, die nur Guanin enthält, und an Guanylnukleinsäure, die Guanin neben wenig Adenin besitzt (5).

Die Befunde von Guanidin bei der Pankreasselbstverdauung gewannen größtes Interesse, nachdem Watanabe (6) zeigte, daß Guanidin eine Hypoglykämie hervorruft. Diese Untersuchungen fanden ihre Bestätigung durch Frank, Nothmann und Wagner (7).

Da aber das Guanidin sich als zu giftig erwies, weil es heftige Krämpfe erzeugt, versuchten Frank und Mitarbeiter Guanidinpräparate herzustellen, die im Gegensatz zum Guanidin den Organismus nicht oder in geringerem Grade schädigten, trotzdem aber den

Blutzucker senkten und die Acidosis beseitigten. Sie nannten ihre Präparate Synthalin bzw. Synthalin B (8).

Diese Beobachtungen von Frank, Nothmann und Wagner mit den Befunden von Kutscher und Otori ließen die Möglichkeit erscheinen, daß von der Bauchspeicheldrüse — abgesehen vom Insulin — ein Inkret mit Guanidinkern abgesondert würde, welches ebenfalls den Kohlehydratstoffwechsel beeinflussen kann. Dieses Inkret braucht nicht freies Guanidin zu sein, sondern eine Substanz, die ähnlich dem Synthalin das giftige Guanidin gekuppelt und in einer für den Organismus unschädlichen Form enthält. Aus dieser hätte das Guanidin bei der Autolyse des Pankreas frei gemacht sein können.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich große Mengen eines der Hauptsache nach vom Insulin befreiten Pankreasextraktes der Untersuchung auf seinen Guanidingehalt unterworfen.

Da es bei den kleinen Verhältnissen, die am hiesigen Marburger Schlachthof herrschen, nicht möglich gewesen wäre, größere Mengen von Rinderpankreas zu erhalten, hatte sich Professor Kutscher an die Firma Hoffmann-La Roche & Co.-Basel mit der Bitte gewandt, ihm die vom Insulin befreiten Mutterlaugen von Rinderpankreas zur Verfügung zu stellen.

Ich möchte hervorheben, daß von allen Firmen, denen Professor Kutscher den Wunsch ausgesprochen hatte ihm solches Material abzugeben, nur Hoffmann-La Roche der Aufforderung entsprach und ich möchte daher dieser Firma, die für die Wissenschaft ein derartiges Entgegenkommen zeigte, den wärmsten Dank der Marburger physiologisch-chemischen Abteilung aussprechen.

Gleich hier an dieser Stelle möchte ich bemerken, daß sich die Voraussetzung, mit der ich an meine Untersuchung herangegangen bin, nicht bestätigt hat. Ich habe in den frischen Extrakten des Pankreas kein Guanidin, sondern nur geringe Mengen von Methylguanidin nachweisen können. Es haben sich aber im übrigen durch meine Untersuchung dieses Pankreasextraktes doch eine Reihe wichtiger Ergebnisse gezeigt, über die ich im Nachfolgenden berichten will, da sie mir von Interesse zu sein scheinen.

Bereits vor mir haben sich namentlich ausländische Forscher mit den insulinfreien Pankreasextrakten des näheren befaßt und sind ebenfalls auf die Frage eingegangen, ob — abgesehen von der Bildung des Insulins — doch nicht noch andere Inkrete von der Bauchspeicheldrüse abgegeben werden. Sie sind dabei auf eine Substanz gestoßen, die den Blutdruck heruntersetzt und die sie als „Vagotonin" bezeichnen. Wir werden später sehen, was dieses Vagotonin jedenfalls ist.

Ich erwähne hier kurz diejenigen Forscher, deren Arbeiten sich mit diesem Problem beschäftigen. Santenoise, Penau, Verdière u. a

waren es, die dieser von ihnen als „Hormon" angesehenen Substanz den Namen Vagotonin gaben (9). Villaret, Besançon und Cachera benennen dieselbe Substanz ganz allgemein nur „Hypotensives" (10). Gley und Kistinios (11) verglichen die Wirkungen des Pankreasextraktes mit den pharmakologischen Eigenschaften von Peptonen, Cholin und Histamin, Substanzen, die den Blutdruck zu senken vermögen. Auf Grund ihrer Untersuchungen kommen sie ebenfalls zu der Anschauung, daß es sich um eine hormonale Wirkung handelt. Durch ihre Arbeiten angeregt, gaben sie das Präparat „Angioxyl" heraus, das sie in folgender Weise darstellten: „Zu 10 ccm alkoholischer Pankreaslösung, die pro ccm 13,2 Einheiten Insulin enthalten, gibt man nach Abdestillieren des Alkohols 10 ccm einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert wird. Im Filtrat entfernt man das Ammoniumsulfat durch Hinzufügen von Alkohol bis zu einer Konzentration von 80% an Alkohol. Es wird filtriert und aus dem Filtrat der Alkohol entfernt."

Hierzu möchte ich bemerken, daß sich in dieser Fraktion natürlich auch das Cholin befände.

Ganz abwegig davon hat man das „Padutin", das ebenfalls ein Extrakt des Pankreas ist und auch den Blutdruck zu senken vermag, auf die Wirkung der Adenylsäure bzw. des Adenosins nicht aber auf das Cholin und Histamin, zurückführen wollen (12). Der Nachweis der Adenylsäure stützt sich namentlich auf pharmakologische Experimente, weiterhin auf das Unwirksamwerden des Extraktes nach Säurehydrolyse, auf das Vorkommen gebundener Pentose, gebundenem Adenin und gebundener Phosphorsäure (13).

Auf diese Verhältnisse werde ich noch näher eingehen, nachdem ich meine eigenen Befunde geschildert habe.

Experimenteller Teil.

Als Ausgangsmaterial standen mir der Extrakt von ca. 100 kg Bauchspeicheldrüsen zur Verfügung. Derselbe war zur Gewinnung von Insulin hergestellt worden. Wie die Firma mitteilt, wurde die Lösung dadurch gewonnen, daß 100 kg Pankreas möglichst bald nach Tötung der Tiere zerkleinert und bei Zimmertemperatur mit angesäuertem wässrigem Alkohol extrahiert wurden. Die alkoholisch-wässrigen Auszüge wurden im Vacuum konzentriert, das Konzentrat von den abgeschiedenen Lipoiden befreit und aus der wässrigen Lösung durch Aussalzen mit Kochsalz das Rohinsulin ausgefällt.

Die Flüssigkeit wurde sofort nach Erhalt verarbeitet. Es waren 25 Liter, die das Filtrat vom Rohinsulin darstellten und noch wenig nicht abgeschiedenes Insulin enthielten. Die Lösung war hellbraun

gefärbt, etwas trüb und enthielt Aether, den man auf Veranlassung von Professor Kutscher zur Konservierung zugab. Bei der mikroskopischen Untersuchung eines Tropfens kristallisierten reichlich Kochsalzkristalle heraus.

Zuvor stellte ich mit der Lauge folgende Farbenreaktionen an:

Biuret	+	rotviolett
Millon	—	
Weyl	+	
Jaffé	+	
Xanthoprotein	+	
Adamkiewicz	+	
Arnold	—	
Schwefel-Blei	—	
Sakaguchi	+	
Paulys Diazo	++	
Ninhydrin	+++	blau-violett (Der Farbstoff ist mit $C_5H_{11}OH$ extrahierbar, wobei die Flüssigkeit selbst eine rubinrote Farbe annimmt.

Danach wurde der wässrige Extrakt unter Einleiten von Kohlensäure stark eingeengt. Dabei kristallisierten große Mengen Natriumchlorid aus. Ich saugte die Kristalle mehrmals ab und reinigte darauf das Filtrat nach den Angaben von Kutscher und Steudel (14) in schwefelsaurer Lösung mit Gerbsäure. Zu dem Zweck wurde bis zur schwach kongosauren Reaktion angesäuert und solange mit einer Gerbsäurelösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Derselbe setzte sich am Boden des Stutzens als zähe Masse ab, sodaß die darüber stehende Flüssigkeit nach 24 Stunden abgegossen werden konnte. Durch Barytwasser wurde das überschüssige Tannin ausgefällt und abfiltriert, das überschüssige Barium durch Schwefelsäure und die überschüssige Schwefelsäure durch Bleioxyd entfernt.

Die so gereinigte Flüssigkeit engte ich wiederum unter Einleiten von Kohlensäure stark ein. Dabei kristallisierten nochmals große Mengen von anorganischen Salzen aus, die abgenutscht und verworfen wurden.

Die Basen fällte ich, nachdem ich die Lösung auf einen Gehalt von 5% an Schwefelsäure brachte, mit 50%iger Phosphorwolframsäure. Dabei war ich darauf bedacht, einen Ueberschuß von Phosphorwolframsäure möglichst zu vermeiden. Die Phosphorwolframsäure fällt in schwefelsaurer Lösung organische Basen nebst Kalium und Ammonium.

Die Fällung wurde nach 24 Stunden abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit einer

warmen Barytlösung zersetzt. Die dabei frei gewordenen Basen wurden zu einem Syrup konzentriert. Dabei konnten große Mengen von Kaliumkarbonat abgetrennt werden.

Zur weiteren Reinigung der Basen fällte ich noch zweimal mit Phosphorwolframsäure um und erhielt danach erst einen rotbraunen klaren Syrup, der spermaartig roch.

Zur letzten Fällung nahm ich nur ⅔ meiner Basenlösung, mit denen ich auch die weiteren Untersuchungen ausführte. ⅓ hielt ich in Reserve, um evtl. meine Befunde nochmals nachkontrollieren und weiter ausbauen zu können. Für diese letzte Fällung benötigte ich 4160 ccm einer 50%igen Phosphorwolframsäurelösung.

Ich machte die merkwürdige Beobachtung, daß mit weiterer Reinigung gegen Schluß der Fällung mit Phosphorwolframsäure nicht mehr sofort eine Fällung eintrat, sondern erst nach geraumer Zeit. Ich nutschte deshalb die sofort eintretende Fällung ab, die ich mit Phosphorwolframsäurefällung I bezeichne, und fällte das Filtrat weiter, wozu ich nochmals 70 ccm des Reagenz fügte. Diese Fällung II hielt ich von obiger getrennt.

Phosphorwolframsäureniederschlag I.

Die Basenlösung dieser Fällung ergab, nachdem ich sie zum starken Syrup eingeengt hatte, folgende Reaktionen:

Biuret	+	rot violett
Millon	±	
Weyl	++	
Jaffé	++	
Xanthoprotein	+	
Adamkiewicz	—	
Arnold	—	
Schwefel-Blei	—	
Paulys Diazo	+++	
Sakaguchi	+++	
Ninhydrin	+++	blau-violett (Der Farbstoff ist ebenfalls mit Amylalkohol extrahierbar. Dies besagt, daß die Flüssigkeit freie Aminosäuren enthält.)

Infolge des öfteren Umfällens verlor sich die Reaktion nach Adamkiewicz, die in der ursprünglichen Lauge schwach positiv ausfiel. Die Millonsche Probe trat in dem gereinigten Syrup gerade merkbar auf. Dagegen hatten sich die Reaktionen nach Weyl und Jaffé merklich verstärkt.

Ausgehend von dem in der Einleitung entwickelten Gedanken, daß in dem Extrakt freies Guanidin resp. ein Guanidinabkömmling in größerer Menge enthalten sein könnte, versuchte ich zunächst

nach der Methode von Emich (17) aus einem Teil der Basenlösung direkt mit Hilfe von Pikrinsäure das Guanidin abzuscheiden. Der Versuch mißlang jedoch. Die Fällung, die ich erhielt, war frei von Guanidin. Sie enthielt nur Kalium, das in beträchtlichen Mengen durch Phosphorwolframsäure mit ausgefällt war.

Da sich auf diesem bequemen Weg kein Guanidin gewinnen ließ, habe ich den umständlichen Gang eingeschlagen, den auch Kutscher und Otori zur Aufarbeitung der bei der Selbstverdauung des Pankreas entstehenden Substanzen benutzt hatten. Ich habe deshalb die Basenlösung in eine Purin-, Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion aufgeteilt. Nun hätte sich das Guanidin in der Argininfraktion auffinden lassen müssen.

Purinbasenfraktion.

Ich nahm den Syrup mit etwas Wasser auf und fällte die Alloxurbasen nach Fr. Kutschers Angaben mit einer 25%igen Silbernitratlösung bei schwach kongosaurer Reaktion. Die Fällung ist weiß, reduziert aber stark. Sie wurde nach 24 Stunden abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen. Die Aufarbeitung machte reichlich Schwierigkeiten, weil gerade diese Fraktion als erste einen beträchtlichen Teil der Schmieren aufzunehmen pflegt.

Histidinfraktion.

Das hellbraune Filtrat der ersten Fällung wurde mit Silbernitrat versetzt, bis eine Probe in gesättigter Barytlösung neben weißen Silberverbindungen gleichzeitig braunes Silberoxyd fallen ließ. Als dies eintrat, wurde solange Barytwasser zugegeben, bis eine Probe mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung keine Fällung mehr ergab. Die sehr geringe Fällung wurde nach 24 Stunden abgesaugt.

Argininfraktion.

Das Filtrat der zweiten Silberfällung wurde mit einer gesättigten wässrigen Barytlösung ausgefällt. Die Fällung sah rostbraun aus, wurde sofort abgesaugt und salpetersäurefrei gewaschen. Daraus stellte ich die kohlensauren Basen dar, die ich zu einem zähen Syrup eindampfte.

Die beiden ersten Fällungen waren für meine Fragestellung nicht von ausschlaggebender Wichtigkeit. Infolgedessen habe ich sie weniger genau bearbeitet wie die sog. Argininfraktion, die das Guanidin enthalten mußte, und die Lysinfraktion, in der ich hoffte den blutdrucksenkenden Körper, das von Penau, Santenoise u. a. bezeichnete „Vagotonin", anzutreffen.

Die Reaktion nach Sakaguchi und die Diazoreaktion nach Pauly fielen sehr stark aus; Weylsche und Jaffésche Proben waren negativ.

Bekanntlich kristallisiert reines Argininkarbonat leicht aus. Obwohl der Syrup lange stand, wollte keine Kristallisation eintreten. Es mußten also Lösungsgenossen vorhanden sein.

Zur Trennung der verschiedenen Stoffe versuchte ich zunächst nach den Angaben von Steudel (15) mit alkoholischer Pikrolonsäure zu fällen. Dies verursachte große Schwierigkeiten, da sich der Syrup mit abs. Alkohol nicht aufnehmen ließ und sich auf Zusatz von gesättigter alkoholischer Pikrolonsäure zu einem zähen Niederschlag zusammenballte. Doch vermochte ich nach dem Verjagen des Aethanols und Aufnehmen mit etwas Wasser eine geringe Fällung abzusaugen. Aus derselben entfernte ich die Pikrolonsäure durch Schwefelsäure nebst Aether und engte die freien Basen zum Syrup ein.

Aus dem Filtrat entfernte ich ebenfalls in der oben geschilderten Weise die überschüssige Prikrolonsäure, säuerte mit Schwefelsäure an und fällte nach den Angaben von Kossel und Groß (16) mit einer wässrigen conc. Flaviansäure. Die abgesaugte Fällung löste sich in der Wärme leicht in überschüssigem Ammoniak. Darauf wurde diese Lösung mit Barytwasser zersetzt, Kohlensäure eingeleitet, mit Tierkohle in schwefelsaurer Lösung entfärbt und schließlich die Karbonate dargestellt.

Dieselben wurden mit denjenigen, die aus der Pikrolonsäurefällung gewonnen waren, vereinigt und zum Syrup konzentriert. Dieser roch stark nach Sperma. Da trotz Impfens mit Argininkarbonat keine Kristallisation eintrat, mußte noch zweimal über das Flavianat gereinigt werden. Erst jetzt kristallisierte das kohlensaure Arginin bereitwilligst aus. Zur Analyse stellte ich das Argininkupfernitrat dar. Es wurden aus 3 Kristallfraktionen insgesamt 5,7 g d-Argininkupfernitrat gewonnen.

Für $(C_6H_{14}O_2N_4)_2\ Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$

	Berechnet	Gefunden		
		I	II	III
Cu	10,77%		10,35	
N	23,78%			23,57
H_2O	9,16%	8,98	9,20	
S.P.	110°–112°C		109,–112°	

Für $(C_6H_{14}O_2N_4)_2\ Cu(NO_3)_2$

	Berechnet	Gefunden
		IV
Cu	11,86%	11,83
C	26,85%	27,29
H	5,26%	5,26
S.P.	232°–234°C	232°

Der mit Flaviansäure nicht fällbare Teil der Argininfraktion wurde von der Flaviansäure befreit und nach den Angaben von Emich mit Pikrinsäure gefällt in der Erwartung, etwa vorhandenes Guanidin als schwer lösliches Pikrat abzuscheiden (17).

Die Fällung war ölig und setzte sich nur z. T. kristallinisch um. Nach mehrtägigem Stehen wurde die überstehende Flüssigkeit von dem am Boden haftenden schweren dickflüssigen Pikrat dekaniert.

Aus der dekantierten Lösung wurde die überschüssige Pikrinsäure mit Salzsäure und Aether entfernt. Die Chloride gaben mit den üblichen Alkaloidfällungsmitteln keinen Niederschlag.

Das ölige Pikrat führte ich ebenfalls in die Chloride über und engte dieselben stark ein. Sie gaben mit 30%iger Goldchloridlösung eine ölige Fällung. Von dieser schüttete ich die überstehende Flüssigkeit ab und engte sie ein. Dabei kristallisierte ein Goldsalz, das abgesaugt und umkristallisiert wurde. Jetzt kam das Aurat in großen Kristallen heraus, die in verdünnter Salzsäure schwer löslich waren und sich als das Goldchloridsalz des Methylguanidins erwiesen.

Die lufttrockenen Kristalle verloren bei 100°—110° C getrocknet nichts an Gewicht.

Für $C_2H_7N_3HClAuCl_3$

	Berechnet	Gefunden		
		V	VI	VII
Au	47,74 %	48,09	47,28	47,47
S. P.	198—200° C	196°		198—200°

Aus der Mutterlauge des Methylguanidins wurde das Gold mit Schwefelwasserstoff beseitigt und die eingedampften Chloride nochmals zu fällen versucht. Doch ist es mir trotz größter Mühe nicht gelungen, eine weitere Substanz abzuscheiden.

Ebenso vermochte ich aus der ölig abgeschiedenen Goldchloridfüllung keine kristallinische Substanz zu gewinnen.

Ich habe also, nachdem ich auf die Argininfraktion die Methodik angewandt hatte, die von Kutscher und Otori eingeschlagen worden war, um das Guanidin aus der Pankreasselbstverdauung zu gewinnen, in frischen Pankreasextrakten kein Guanidin darstellen können, trotzdem mir die Erfahrungen der früheren Arbeit von Kutscher und Otori zur Verfügung standen und ich auch mit Hilfe der von Kossel eingeführten Flaviansäure das Arginin beseitigen konnte, das die Darstellung des bei der Pankreasselbstverdauung entstandenen Guanidins stark behinderte.

Nachdem also die Aufarbeitung der Argininfraktion zeigte, daß darin außer dem Methylguanidin keine weitere physiologisch wirksame Substanz steckte, müßte ich, wenn eine solche vorhanden ist, in Filtrat der Argininfraktion auf sie stoßen.

Lysinfraktion.

Das Filtrat der Argininfraktion wurde mit Schwefelsäure und Salzsäure von Barium und Silber befreit. Der Niederschlag wurde entfernt, das hellgelbe klare Filtrat auf 5 Vol.% an Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Dazu mußte ich 2680 ccm einer 50%igen Lösung verwenden.

Es bereitete große Schwierigkeiten den Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure salpetersäurefrei zu waschen. Nach der üblichen Zersetzung fiel die Probe auf Salpetersäure mit dem Diphenylaminreagenz immer noch positiv aus. Deshalb wurden die freien Basen nochmals gefällt. Diesmal war die Fällung schon bei Zusatz von 1820 ccm beendet. Demnach existierten in verdünnter Schwefelsäure sehr leicht lösliche Phosphorwolframate, die mir durch das Auswaschen leider verloren gingen.

Nach der Zersetzung wurden die Karbonate zum Syrup eingeengt. Dieser gab nur noch eine schwach positive Biuret-Reaktion, einen eben angedeuteten Sakaguchi und eine sehr starke Ninhydrin-Probe. Bei dieser zeigte sich wiederum die oben beschriebene Erscheinung.

Aus dem Syrup kristallisierten nochmals große Mengen von Kaliumkarbonat, die sich durch Aufnehmen mit Methanol abtrennen ließen. Nach dem Verjagen des Methylalkohols wurde der syrupöse Rückstand mit absolutem Aethanol aufgenommen und mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Vermeidung eines Ueberschusses völlig ausgefällt. Dabei verbrauchte ich 1980 ccm Pikrinsäurelösung.

Nach einigen Tagen wurde die reichliche Fällung abgesaugt, mit abs. Alkohol gewaschen und das Filtrat eingeengt. Dabei kamen nochmals große Mengen von gut ausgebildeten langen Nadeln heraus.

Nachdem diese abgesaugt waren, befreite ich das Filtrat von Aethanol und führte es mit Hilfe von Salzsäure und Aether in eine Lösung von Chloriden über. Ich teilte also die Lysinfraktion in drei Teile:

I. In Alkohol unlösliche Pikrate
II. In Alkohol lösliche Pikrate
III. Mit Pikrinsäure nicht fällbarer Anteil.

I. In Alkohol unl. Pikrate.

Mit einigen wohlausgebildeten Kristallen machte ich eine Schmelzpunktbestimmung. Sie schmolzen bei 240° C. Den gleichen Schmelzpunkt hat Cholinpikrat.

Beilstein gibt an	240° C
Lohmann gibt an	245°—246° C

Die Pikrate wurden daraufhin in die Chloride übergeführt, die beim Einengen zu einem Kristallbrei erstarrten. Aus diesem vermochte ich durch mehrmaliges Aufnehmen mit abs. Alkohol größere Mengen eines völlig farblosen Chlorides zu gewinnen, die in abs. Alkohol weniger löslich waren als in Wasser. Die Kristalle waren nicht luftbeständig. Das aus ihnen dargestellte Aurat gab sofort die verlangten Werte für Cholingoldchlorid.

Für $C_5H_{14}NO.Cl.AuCl_3$

	Berechnet	Gefunden				
		VIII	IX	X	XI	XII
Au	44,50 %	44,43	44,31	44,53	44,79	45,02
C	13,53 %					13,50
H	3,18 %					3,22
S. P.	257°,267—270°	249°C		262°C	260°C	259°C

Nachdem auf diese Weise der größte Teil abgetrennt worden war, wurde der Rest mit Alkohol aufgenommen, in der Hitze mit Sublimat gesättigt, die Fällung abgesaugt und mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung gewaschen. Den Quecksilberchloridniederschlag befreite ich nach Auflösen in verd. Salzsäure mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und engte das Filtrat auf ein kleines Volumen ein. Das daraus dargestellte Aurat in der Mutterlauge umkristallisiert und bei mäßiger Wärme eingeengt, ergab 3 Kristallfraktionen. Die Analysenwerte stimmten für Cholingoldchlorid.

Für $C_5H_{14}NO.Cl.AuCl_3$

	Berechnet	Gefunden		
		XIII	XIV	XV
Au	44,50 %	44,70	44,30	44,63
C	13,54 %	13,77		
H	3,18 %	3,23		
S. P.	267—270°C	267—270°	267°	

Aus dem Filtrate der alkoholischen Quecksilberfällung wurden die Chloride dargestellt und mit 30%iger Platinchloridlösung gefällt. Beim Umkristallisieren dieses Platinsalzes in verd. Salzsäure kommt es in hellbraunen Plättchen und Prismen heraus. Die Analyse zeigte, daß hier ein Gemisch von Betain- und Sperminplatinat vorlag.

	Für $C_{10}H_{26}N_4\ 2H_2PtCl_6$		Für $(C_5H_{12}NO_2Cl)_2PtCl_4$
	Berechnet	Gefunden	Berechnet
		XVI	
Pt	38,20 %	35,17	30,26
C	11,74 %	13,59	18,64
H	2,96 %	2,83	3,76

Aus dem Filtrat der Platinfällung gewann ich durch Entfernen des überschüssigen Platins mit Schwefelwasserstoff die Chloride. Diese bildeten noch einen beträchtlichen Syrup, den ich bisher noch nicht aufteilen konnte.

In Alkohol lösliche Pikrate.

Diese wurden nach Lösen in Wasser mit Salzsäure im Ueberschuß versetzt. Die frei gewordene Pikrinsäure beseitigte ich durch Abfiltrieren nebst Ausäthern und erhielt nach vorsichtigem Eindampfen der salzsauren Lösung einen Kristallbrei, aus dem wiederum ein großer Teil der Chloride durch mehrmaliges Aufnehmen mit abs. Aethanol abgetrennt werden konnte. Diese bestanden aus feinen farblosen Nädelchen, die in Alkohol nicht ganz unlöslich waren und hygroskopisch sind. Zur Identifizierung wurde ein Teil ins Chloraurat übergeführt, das nach dem Umkristallisieren in schwerlöslichen Nadeln herauskam und folgende Analysenwerte ergab:

Für $C_5H_{14}NO.Cl.AuCl_3$

	Berechnet	Gefunden		
		XVII	XVIII	XIX
Au	44,50 %	44,62	44,40	44,53
C	13,54 %	13,72		
H	3,18 %	3,21		
S. P.	267—270°C	264°		

Demnach handelte es sich wiederum um das Goldchlorid des Cholins. Das Cholinchlorid ist bekanntlich in Alkohol leicht löslich. Wenn es mir trotzdem gelang größere Teile aus der Mutterlauge mit Alkohol abzutrennen, so lag das daran, daß ich große Mengen davon in die Hände bekam. Das Nachwaschen mit Aethanol ging auch mit erheblichen Verlusten einher. Trotzdem war dieses Arbeiten mit Zeitersparnis verbunden, da die Zerlegung der Quecksilberchloridsalze sehr langwierig ist.

Dem übrigen Teil der Chloride wurde in alkoholischer Lösung in der Hitze festes gepulvertes Sublimat im Ueberschuß zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt, mit gesättig-

ter alkohol. Sublimatlösung gewaschen und in verd. Salzsäure gelöst. Das Quecksilber wurde als Quecksilbersulfid niedergeschlagen und abgesaugt. Die eingeengten Chloride ergaben im Vorversuch eine Fällung mit Goldchlorid. Daraufhin führte ich einen Teil in die Goldverbindung über. Die Fällung wurde durch Erhitzen der Mutterlauge zur Lösung gebracht. Beim Erkalten der Flüssigkeit kamen schöne große Nadeln heraus. Ich lasse die Analyse folgen, die richtige Werte für Cholinaurat lieferte.

Für $C_5H_{14}NO.Cl.AuCl_3$

	Berechnet	Gefunden		
		XX	XXI	XXII
Au	44,50 %	45,01	44,43	45,02
C	13,54 %	13,77		
H	3,18 %	3,59		
S. P.	267—270°	259—260°	266—267°C	

In das Filtrat der Quecksilberfällung leitete ich nach Abdunsten des Alkohols Schwefelwasserstoff. Die vom Quecksilbersulfid befreite Lösung wurde zur Konzentration gebracht und daraus 45 mg eines Aurats gewonnen, das nicht einheitlich zu sein scheint.
XXIII: 45,97% Au.

Mit Pikrinsäure nicht fällbarer Anteil.

Nachdem diese Fraktion in die Chloride übergeführt war, wurden diese zu einem Syrup eingeengt, der nach einigen Tagen zu einem Kristallbrei erstarrte. Diesen nahm ich mehrmals mit absolutem Alkohol auf, wodurch sich ein in Alkohol unlöslicher Teil abtrennen ließ.

Derselbe in verdünnter Salzsäure umkristallisiert und mit Tierkohle entfärbt, gab mit einer 30%igen Goldchloridlösung eine Fällung, deren Kristalle unter dem Mikroskop betrachtet verschiedenes Aussehen zeigten.

Durch mehrmaliges fraktioniertes Umkristallisieren und mechanisches Auslesen der verschiedenen Kristalle, die zwecks Reinigung mehrmals aus verd. Salzsäure umkristallisiert wurden, vermochte ich zwei Aurate voneinander zu trennen, deren Analysen zu den Goldsalzen von Betain und Spermin stimmten.

Die Betaingoldchloridkristalle waren feine glänzende hellgoldgelbe Blättchen.

Für $C_5H_{12}O_2N.AuCl_4$

	Berechnet	Gefunden XXIV
Au	43,14%	43,17
C	13,13%	13,33
H	2,71%	2,71
S.P.	209—238° C	238°

Das Sperminaurat schied sich in gut ausgebildeten Drusen ab.

Für $C_{10}H_{26}N_44(HAuCl_4)$

	Berechnet	Gefunden XXV	XXVI	XXVII
Au	50,50 %	50,59	50,14	50,58
C	7,68 %	7,45		
H	1,94 %	1,77		
S. P.	216—218°C	216—217°C	217	214—17

Die alkoholische Mutterlauge dieser Chloride wurde in der Hitze mit Quecksilberchlorid gesättigt, die Fällung nach 24 Stunden abgesaugt, mit gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung gewaschen und in salzsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das ausgefallene Schwefelquecksilber saugte ich ab und engte die Chloride zum Syrup ein.

Aus diesem kristallisierten 0,62 g eines Chlorides, das sich durch abs. Alkohol, in dem es unlöslich ist, von der größten in Alkohol löslichen Masse abtrennen ließ. Die Analyse zeigte, daß hier nochmals Betainchlorid vorlag.

Für $C_5H_{11}NO_2HCl$

	Berechnet	Gefunden XXVIII
C	39,06%	39,08
H	7,87%	7,75
S.P.	227—228° C	228—229° C

Einen Teil führte ich ins Aurat über. Das sich abscheidende Goldsalz wurde umkristallisiert und in drei Fraktionen ausgefällt. Es kam in goldgelben Flitterchen heraus und glich demnach auch in seinem Aeußeren dem Betaingoldchlorid. Meine Analyse ergab folgende Werte:

Für $C_5H_{12}O_2NAuCl_4$

	Berechnet	Gefunden		
		XXIX	XXX	XXXI
Au	43,14 %	43,53	43,28	43,20
C	13,13 %	13,45		
H	2,71 %	2,55		
S. P.	209—238°C		237	238°C

Durch diese Analysen ist mit Sicherheit erwiesen, daß es sich bei der vorliegenden Substanz um Betain handelt.

Nachdem ich das Betain abgetrennt hatte, wurde aus dem Filtrat der Alkohol verjagt, mit Wasser aufgenommen und diese alkohollöslichen Chloride mit einer 30%igen Goldchloridlösung gefällt. Nach dem üblichen Umkristallisieren konnte Cholinaurat nachgewiesen werden.

Für $C_5H_{14}NOClAuCl_3$

	Berechnet	Gefunden		
		XXXII	XXXIII	XXXIV
Au	44,50 %	44,12	44,09	44,16
C	13,54 %	13,85		
H	3,18 %	3,03		
S. P.	257° C	257° C		

Aus der alkoholischen Mutterlauge der ersten Quecksilberfällung kristallisierten beim teilweisen Verjagen des Alkohols noch Quecksilberchloriddoppelsalze heraus, die ich von der zuerst abgeschiedenen Fällung getrennt verarbeitete. Dieser Teil bestand aber ebenfalls nur aus Verbindungen des Betains und Cholins. Zur Analyse stellte ich aus ihnen die schwerlöslichen Aurate dar.

	Gefunden		Gefunden
	XXXV	XXXVI	XXXVII
Au	43,91	43,45 %	44,54 %
S. P.	206°—232°C; 209—238°C		

Nachdem aus dem Filtrat obiger Quecksilberfällungen der Alkohol durch vorsichtiges Eindampfen ganz entfernt worden war, wurde der Rückstand in verd. Salzsäure gelöst und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff das Quecksilber niedergeschlagen und abfiltriert.

Die Chloride wurden zum Syrup eingedampft und in alkoholischer Lösung mit 30%iger Platinchloridlösung gefällt. Die geringe Fällung wurde abgesaugt, mit abs. Alkohol ausgewaschen und in verd. Salzsäure umkristallisiert. Ein geringes schwerlösliches Pla-

tinsalz verwarf ich. Der übrige Teil wurde über die Chloride ins Aurat übergeführt und analysiert. Es zeigte sich, daß Spermingoldchlorid vorlag.

Für $C_{10}H_{26}N_4 4(HAuCl_4)$

	Berechnet	Gefunden	
		XXXVIII	XXXIX
Au	50,50 %		50,49
C	7,68 %	7,28	
H	1,94 %	2,04	

Aus dem Filtrat der Platinfällung wurde nach dem Entfernen des Alkohols das Platin als Platinsulfid niedergeschlagen und abfiltriert.

Die zum Syrup eingeengte Lösung nahm ich mit absol. Alkohol auf und versetzte sie abwechselnd mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung und gesättigter alkohol. Natriumacetatlösung. Ich konnte nur eine geringe zähe schmierige Masse niederschlagen, die keine Neigung zur Kristallisation zeigte.

Davon goß ich die überstehende Flüssigkeit ab und zersetzte sowohl Niederschlag als auch dessen Mutterlauge mit Schwefelwasserstoff. Während mit den Chloriden der Mutterlauge die üblichen Alkaloidfällungsmittel keinen Niederschlag gaben, vermochte ich aus den Chloriden des Niederschlags mit Goldchlorid ein schwerlösliches Oel abzuscheiden, das sich in der Hitze löste, sich aber wieder ölig abschied. Durch Abgießen der darüberstehenden Flüssigkeit wurde es isoliert, war aber weder in verd. noch in konzentr. Salzsäure zur Kristallisation zu bringen. Darauf stellte ich aus dem Aurat erneut die Chloride dar. Bis jetzt ist es mir aber noch nicht gelungen, aus der letzten Fraktion eine wohlcharakterisierte kristallinische Substanz zu erhalten.

Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung.

Der mit Phosphorwolframsäure nicht fällbare Anteil der Insulin-Mutterlauge wurde mit der Spülflüssigkeit vereinigt und daraus die überschüssige PhWS. durch Baryt entfernt. Da die stark eingeengte Flüssigkeit auch nach längerem Stehen keine Kristallisation zeigte, habe ich sie mit Schwefelsäure stark angesäuert und im kontinuierlichen Aetherextraktapparat lange Zeit extrahiert.

Nachdem ich aus dem Aetherextrakt den Aether abdunsten ließ, wurde der Rückstand solange mit strömendem Wasserdampf destilliert, bis die übergehende Flüssigkeit nicht mehr gegen Lakmus sauer reagierte. Auf diese Weise teilte ich die vom Aether aufgenommenen Säuren.

A. Mit Wasserdampf flüchtige Säuren.

Dieselben wurden mit Natriumkarbonat neutralisiert und auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht. Die Natriumsalze fällte ich daraufhin nach genauer Neutralisation mit Salpetersäure nach dem Verfahren Liebigs fraktioniert aus mit konz. Silbernitratlösung.

	Für $C_2H_3O_2Ag$	Für $C_3H_5O_2Ag$		
	Berechnet	Berechnet	Gefunden	
			XL	XLI
Ag	64,64 %	59,65 %	64,13	62,47

Die erste Fraktion bestand demnach aus fast reinem essigsaurem Silber; die zweite Fraktion ungefähr zu gleichen Teilen aus Essigsäure und Propionsäure.

	Für $C_2H_3O_2Ag$	Für CHO_2Ag	
	Berechnet	Berechnet	Gefunden
			XLII
Ag	64,64 %	70,6 %	65,09 %

Die III. Fraktion war also durch ein wenig Ameisensäure verunreinigt. Sie zeigte auch die stärkste Reduktionserscheinung.

B. Mit Wasserdampf nicht flüchtige Säuren.

Nachdem diese auf ein kleines Volumen eingeengt waren und durch den negativen Ausfall der Millonschen Probe aromatische Oxysäuren ausgeschlossen werden konnten, wurden sie mit Zinkoxyd im Ueberschuß gekocht, sofort filtriert und das Filtrat eingeengt. Die dabei herausgekommene Kristallisation wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Zur Reinigung wurde sie in wässriger Lösung mit Tierkohle entfärbt. Jetzt kam eine völlig weiße Kristallisation zustande. Diese erwies sich in 2 Fraktionen als das Zinksalz der Fleischmilchsäure.

Für $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O$

	Berechnet	Gefunden	
		XLIII	XLIV
H_2O	12,89 %	13,17	12,88

Für $(C_3H_5O_3)_2Zn$

	Berechnet	Gefunden	
		XLV	XLVI
Zn	26,86%	26,78	26,67

Die Zinksalze wurden jeweils zwischen 100—110° C gewichtskonstant gemacht.

Das Zinksalz der Fleischmilchsäure hat einen Schmelzpunkt, der bis jetzt noch nicht ermittelt zu sein scheint, da ich in den üblichen chemischen Handbüchern keine Angaben finden konnte. Das kristallwasserhaltige fleischmilchsaure Zink schmilzt bei 256—257° C unter Zersetzung, nachdem es einige Grade vorher eine etwas bräunliche Verfärbung angenommen hat.

Der Schmelzpunkt des gärungsmilchsauren Zinks liegt etwas höher bei 260—263° C und geht ebenfalls mit Zersetzung einher. Auch hierüber fand ich bisher keine Angaben.

Erwäge ich die Resultate meiner Untersuchung, so weisen zunächst die Farbenreaktionen, die mit der mir zur Verfügung stehenden Insulinmutterlauge angestellt wurden darauf hin, daß darin Spuren einer Substanz waren, die die schwache Biuret-Reaktion veranlaßte. Dieselbe ist durch die üblichen von mir verwandten Fällungsmittel — abgesehen von der Phosphorwolframsäure — und durch Sättigung mit Kochsalz nicht fällbar. Es muß sich um eine Substanz handeln, die einfach zusammengesetzt ist, vielleicht ein Peptid, dem Tyrosin, Cystin und Cystein fehlen (Millon-, Arnold- und Schwefelbleireaktion negativ). Sie ließ sich mit den gleichen Eigenschaften durch PhWS. niederschlagen und ging bis zur Lysinfraktion durch. Rein darzustellen vermochte ich sie nicht.

Gehe ich die einzelnen Fraktionen bzgl. ihrer Eigenschaften und ihrer Substanzen, die ich aus ihnen darzustellen vermochte, durch, so ergibt sich Folgendes:

Die Fraktion der Purinkörper habe ich bisher noch nicht ganz aufgeteilt. Ich vermag aber bereits jetzt an Hand meiner laufenden Untersuchungen zu sagen, daß sie 139 mg Adeninaurat, 0,61 g Hypoxanthinaurat und 95,5 mg Xanthin enthält.

In meiner Einleitung habe ich die Arbeit von Zipf (13) erwähnt, der die Blutdrucksenkung eines insulinfreien Pankreasextraktes auf Adenylsäure bzw. Adenosin bezieht. Meiner Meinung nach müßte ich, wenn die Voraussetzungen von Zipf richtig sind, beträchtlichere Mengen an Adenin bekommen haben, da ich ja sehr große Mengen Pankreasextraktes verarbeitet habe.

Auch das Histamin kommt jedenfalls bei den Substanzen, die den Blutdruck erniedrigen, kaum in Betracht. Es hätte in die Histidin-Fraktion gehen müssen. An sich war schon die Silberfällung, die Histamin aufnehmen mußte, sehr gering. Es ist mir bisher trotz aller Versuche nicht gelungen weder Histidin noch Histamin, die doch leicht kristallisierende Verbindungen liefern, darzustellen.

Sehr genau ist von mir die sog. Argininfraktion beforscht worden. Ich habe daraus, abgesehen von d-Arginin und Methylguanidin keine weitere organische Base namentlich kein Guanidin darstellen können. Ich will aber die Frage offen lassen, ob doch nicht vom Pankreas ein Guanidinderivat in sehr geringen Mengen in den Organismus als Inkret abgegeben wird, denn wir wissen aus den Untersuchungen der anderen Drüsen mit innerer Sekretion, daß schon Spuren der verschiedenen Inkrete genügen, um den Organismus in weitgehender Weise zu beeinflussen. Ich möchte hier an die Arbeiten von Takamine erinnern, der als erster ein Hormon darstellte und nur durch die Schlachthäuser von Chikago genügend Nebennieren erhalten konnte, aus denen er das Adrenalin darstellte. Ebensowenig wäre es wahrscheinlich Butenandt, dessen ausgezeichnete Arbeiten z. Zt. allgemeines Aufsehen erregen, gelungen, die Follikelhormone zu isolieren, wenn er nicht in weitgehendem Maße die Unterstützung großer Fabriken gehabt hätte, die ihm aus mächtigen Mengen Ausgangsmaterials ein Rohprodukt zur Darstellung der Sexualhormone lieferten.

Außerdem wird die Darstellung von Guanidin dadurch erschwert, daß Lösungsgenossen, von denen uns das Arginin bekannt ist (1 u. 18), seine Abscheidung mit dem besten Fällungsmittel der Pikrinsäure verhindern. Weiterhin wird das Guanidin von der PhWS. nicht quantitativ, sondern nur zu ⅔ niedergeschlagen (19).

Ein kleiner Teil der Argininfraktion ist noch nicht aufgeteilt. Ich werde darüber später berichten.

Das Arginin könnte unter dem Einfluß des Trypsins aus dem Eiweiß entstanden sein. Doch glaube ich nicht daran, weil alle anderen Aminosäuren, die sonst durch das Trypsin entstehen, fehlen. Auch die Verarbeitung des Materials, über die uns die Firma Angaben machte, schließen eine Wirkung des Trypsins und der anderen Fermente, die im Pankreas drin stecken, aus. Die Bauchspeicheldrüsen wurden nämlich lebendfrisch mit verdünntem angesäuertem Alkohol extrahiert, und wir wissen, daß das Trypsin nur bei schwach alkalischer Reaktion seine stärkste Wirkung entfaltet.

Ich habe schon vorher erwähnt, daß ich kein Histidin bekommen konnte. Ich werde nachher zeigen, daß auch das Lysin fehlt und ebenso haben die Farbenreaktionen den Mangel an Tyrosin, Cystin und Cystein gezeigt. Das Arginin muß also in den frischen Drüsen als ursprünglicher Extraktstoff vorhanden sein. Die Ausbeute an d-Argininkupfernitrat betrug 5,7 g; die an Methylguanidinaurat 0,72 g.

Ich wende mich nunmehr den Ergebnissen zu, die ich bei Aufarbeitung der sog. Lysinfraktion, die hier den Namen durchaus nicht verdient, weil ich gar kein Lysin darstellen konnte, erhielt. Beherrscht wird die Lysinfraktion vom Cholin, das überhaupt diejenige

Base ist, die in größter Menge in der Insulinmutterlauge vorkam. Ich erhielt aus der Lysinfraktion 65,76 g Cholinchlorid und 14,76 g Cholinaurat. Diese Mengen entsprechen 61,10 g freiem Cholin. Da der Extrakt von ca. 65 kg Bauchspeicheldrüsen zur Verarbeitung kam, so enthielten demnach 1 kg Pankreas 940 mg Cholin.

Um diese großen Mengen von Cholin zu würdigen, lasse ich einige Vergleichszahlen folgen:

Der Cholingehalt einer ausgereiften Placenta, deren Durchschnittsgewicht 500 g beträgt, ist 45—90 mg (20 u. 21). Flößner gewann aus den Ovarien des Schweins mit dem Durchschnittsgewicht von 7,5 g 0,019 mg Cholin. Die Nebenniere des Rindes enthält nach Lohmann im Mittel 3,07 mg Cholin. Smorodinzew isolierte pro kg Leber 720 mg Cholin. E. Strack, Neubaur und Geißendörfer konnten im günstigsten Falle aus einem kg Rinderleber 680 mg Cholin erhalten. (22—25).

In dem Cholin, das sich in so reichlicher Menge in der Insulin-Mutterlauge vorfand, haben wir wahrscheinlich das „Vagotonin" der in meiner Einleitung genannten Forscher vor uns. Durch die Arbeiten Lohmanns (26), die derselbe 1907 im hiesigen Institut ausführte und die sich mit den schon früher veröffentlichten Mitteilungen von Mott und Halliburten (27) decken, sind wir über die blutdrucksenkende Wirkung des Cholins genau unterrichtet und wissen, daß es in vieler Beziehung dem Adrenalin, das den Sympathicus beeinflußt, entgegengesetzte physiologische Wirkungen hervorruft, da es den Parasympathicus zu erregen vermag.

Auch schon eine Anzahl früherer Forscher, so namentlich Gley und Kisthinios nahmen an, daß die blutdrucksenkende Wirkung des Extraktes der Bauchspeicheldrüse z. T. dem Cholin zuzuschreiben ist. Eine ähnliche Meinung vertreten Gautrelet, Santenoise und Penau. Doch lassen alle diese Forscher im Zweifel, ob neben dem Cholin noch ein anderes blutdrucksenkendes Hormon abgegeben wird, denn der insulinfreie Pankreasextrakt soll auch bei atropinisierten Tieren den Blutdruck in Chloroformnarkose senken, was Cholin nicht tun soll.

Alle diese Forscher haben sich darauf beschränkt, Cholin durch die unzuverlässigen pharmakologischen Reaktionen und durch die Probe von Florence, höchstens durch Fällung mit Platinchlorid nachzuweisen (28); doch hat sich keiner die Mühe gegeben, es rein darzustellen. Von mir ist das Cholin isoliert und analysiert worden.

Ich habe mir größte Mühe gegeben, daneben auf den Blutdruck stark einwirkende andere Substanzen aufzufinden. Es ist mir nicht gelungen.

Viel schwieriger ist die Frage zu erledigen, ob wir im Cholin ein Hormon des Pankreas vor uns haben, namentlich nachdem aus dem Institut von Thomas eine Arbeit erschienen ist, in der sich Strack,

Neubaur und Geißendörfer (25) mit Leberextrakten befaßten und dabei feststellten, daß lebensfrische Lebern kaum Cholin enthalten; dieses aber schon in großen Mengen nachzuweisen ist, wenn das betr. Organ erst einige Stunden nach dem Tode zur Verarbeitung genommen wird. Außerdem kann während der Verarbeitung Cholin aus größeren Molekülkomplexen abgespalten werden, wenn man mit hohen Säurekonzentrationen arbeitet.

Diese Möglichkeiten kommen für mein Material nicht in Betracht. Schon für die Darstellung von Insulin ist es notwendig, möglichst frische Drüsen zu verarbeiten, da anderenfalls durch das Trypsin das Insulin zerstört werden kann. Dementsprechend gehen denn auch Hoffmann-La Roche so vor, daß sie die lebendfrischen Drüsen zur Verarbeitung nehmen, indem sie auf dieselben nach der Zerkleinerung salzsauren Alkohol einwirken lassen und so die Tätigkeit der Fermente ausschließen.

Die letztere Annahme kommt hier ebenfalls nicht in Betracht, da die Fabrik, die uns das Ausgangsmaterial zur Verfügung stellte, schon deshalb bes. vorsichtig arbeiten muß, weil sie sonst das Insulin zerstört.

Danach würde das Cholin in der Tat ein Hormon sein können, das vom Pankreas gebildet wird und bei der Regulierung des Blutdrucks resp. als Peristaltikhormon (29) eine wichtige Rolle spielen muß. Auch weil es die vorherrschende Base im insulinfreien Pankreasextrakt darstellt, möchte ich annehmen, daß es wirklich zur hormonalen Wirkung bestimmt ist.

Die Wirkungen des Cholins sind, abgesehen von seiner Beeinflussung des Blutdrucks und der Darmbewegung außerordentlich vielfältig. Wir wissen, daß es verschiedene Drüsen anregt, und es wäre möglich, daß sein Auftreten in der Bauchspeicheldrüse dem Zweck dienen könnte, dieselbe in ihrer Funktion zu steigern und die Drüsentätigkeit zu erhöhen.

Da meine Untersuchungen das Cholin als Hauptbase der Insulin-Mutterlauge ergeben hat, wäre festzustellen, ob es sich auch unter den Sekretstoffen befindet und mit diesen in den Darm abgegeben wird. Dahingehende Untersuchungen sind m. W. bisher noch nicht angestellt worden.

In weitem Abstand vom Cholin folgt seinem Gewichte nach das Betain (8,33 g Betainaurat und 0,82 g Betainchlorid), das ich durch Analyse festzulegen vermochte. Man hat es aus vielen Kaltblütern (30—33) in beträchtlichen Mengen darstellen können und es ist im Organismus dieser Tiere, die ähnlich der Pflanze eine große Methylierungsfähigkeit besitzen, aus dem Glykokoll entstanden. Sehr zweifelhaft ist mir aber, ob auch das von mir in der Insulinmutterlauge erfaßte Betain im Organismus des Rindes gebildet wurde.

Allerdings beschreibt Bebeschin (34) sein Vorkommen in Ochsennieren. Fr. Kutscher wies in einer früheren Abhandlung darauf hin, daß dieser Befund wahrscheinlich dahin zu deuten sei, daß dieses Betain auf dem Wege, den es von der Aufnahme aus Pflanzennahrung, die daran reich ist, bis zur Ausscheidung durch den Harn zufällig erfaßt wurde. Diese Ansicht trifft wahrscheinlich auch für das von mir hier isolierte Betain zu. Um diese Frage endgültig zu entscheiden, müßte man den Pflanzenfresser mit einer betainfreien Kost ernähren.

Durch die Untersuchungen von Kohlrausch (35) sind wir darüber unterrichtet, daß Pflanzen- und Fleischfresser per os oder subcutan zugeführtes Betain z. T. unzersetzt im Harn ausscheiden. Auch durch Ackermann und seine Schüler ist in groß angelegten Versuchen die Widerstandsfähigkeit der Betaine im tierischen Organismus gezeigt worden.

Vom Spermin konnte ich aus der Mutterlauge 1,77 g des Aurats gewinnen. Wrede, dem wir die wichtigsten Arbeiten seit der Entdeckung des Spermins durch Schreiner (36) verdanken, gibt das Pankreas als dasjenige Organ an, aus dem man am reichlichsten Spermin gewinnen kann (37). So ließ sich erwarten, daß auch ich es auffinden würde.

Die physiologische Bedeutung des Spermins ist noch wenig bekannt. Wrede erwähnt lediglich, daß seine Wirkung ähnlich der des Cholins ist. Größere Dosen verursachen im Tierversuch eine langanhaltende Blutdrucksenkung.

Nach Entfernung des Spermins blieb noch ein beträchtlicher Syrup zurück, den ich bisher noch nicht zerlegen konnte.

Die organischen Säuren Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Fleischmilchsäure sind jedenfalls im intermediären Stoffwechsel entstanden und als normale Stoffwechselprodukte zu werten.

Zusammenfassung.

Vor mir sind aus der Insulinmutterlauge bisher dargestellt worden: Adenin, Xanthin, Hypoxanthin, Methylguanidin, Arginin, sowie Cholin, das hinsichtlich seiner Menge alle übrigen Basen bei weitem übertrifft; dann Betain und Spermin. Im Säureteil Ameisensäure, Essigsäure- Propionsäure und Fleischmilchsäure. Beträchtliche Teile des Extraktes erwiesen sich den Methoden gegenüber, die ich anwandte, unzugänglich.

Das von zahlreichen Forschern in der Bauchspeicheldrüse gefundene auf den Blutdruck wirkende neue Hormon, das sie als „Vagotonin" bezeichnen, ist meiner Ansicht nach mit Cholin identisch.

Es sei mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. med. et phil. h. c. Fr. Kutscher für die wertvolle Unterstützung und die dauernde Hilfe bei Ausführung dieser Arbeit meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Der Marburger Medizinischen Fakultät spreche ich für die mir aus der Gräfin-Bose-Stiftung für einen Teil der vorliegenden Arbeit gewährte Beihilfe meinen ergebensten Dank aus.

Analytische Belege.

I.	0,1670 g	Subst. gaben	0,0150 g K.W.
II.	6,335 mg	„ „	0,583 mg K.W.
			0,821 mg CuO.
III.	5,757 mg	„ „	bei T = 19,8° C u.Ba. = 746mm
			1,186 ccm N
IV.	0,1270 g	„ „	0,0188 g CuO
			0,1271 g CO_2
			0,0596 g H_2O
V.	0,1204 g	„ „	0,0579 g Au
VI.	4,325 mg	„ „	2,045 mg Au
VII.	2,052 mg	„ „	0,947 mg Au
VIII.	0,1042 g	„ „	0,0463 g Au
IX.	7,001 mg	„ „	3,102 mg Au
X.	20,191 mg	„ „	8,992 mg Au
XI.	9,309 mg	„ „	4,169 mg Au
XII.	0,1224 g	„ „	0,0551 g Au
			0,0606 g CO_2
			0,0352 g H_2O
XIII.	0,1396 g	„ „	0,0624 g Au
			0,0705 g CO_2
			0,0403 g H_2O
XIV.	4,781 mg	„ „	2,118 mg Au
XV.	10,620 mg	„ „	4,740 mg Au
XVI.	0,1268 g	„ „	0,0446 g Pt
			0,0632 g CO_2
			0,0321 g H_2O
XVII.	0,1170 g	„ „	0,0522 g Au
			0,0598 g CO_2
			0,0336 g H_2O
XVIII.	6,457 mg	„ „	2,867 mg Au
XIX.	10,535 mg	„ „	4,691 mg Au
XX.	0,1042 g	„ „	0,0469 g Au
			0,0526 g CO_2
			0,0334 g H_2O
XXI.	3,063 mg	„ „	1,361 mg Au
XXII.	4,089 mg	„ „	1,841 mg Au
XXIII.	7,821 mg	„ „	3,595 mg Au
XXIV.	0,1678 g	„ „	0,0726 g Au
			0,0820 g CO_2
			0,0407 g H_2O
XXV.	0,1101 g	„ „	0,0557 g Au
			0,0300 g CO_2
			0,0174 g H_2O

XXVI.	3,536 mg	„	„	1,773 mg	Au
XXVII.	4,607 mg	„	„	2,330 mg	Au
XXVIII.	0,0910 g	„	„	0,1304 g	CO_2
				0,0630 g	H_2O
XXIX.	0,1438 g	„	„	0,0626 g	Au
				0,0709 g	CO_2
				0,0328 g	H_2O
XXX.	9,409 mg	„	„	4,072 mg	Au
XXXI.	2,477 mg	„	„	1,070 mg	Au
XXXII.	0,1174 g	„	„	0,0518 g	Au
				0,0596 g	CO_2
				0,0318 g	H_2O
XXXIII.	6,449 mg	„	„	2,843 mg	Au
XXXIV.	7,391 mg	„	„	3,264 mg	Au
XXXV.	5,871 mg	„	„	2,678 mg	Au
XXXVI.	5,143 mg	„	„	2,235 mg	Au
XXXVII.	2,846 mg	„	„	1,267 mg	Au
XXXVIII.	0,1146 g	„	„	0,0306 g	CO_2
				0,0209 g	H_2O
XXXIX.	4,205 mg	„	„	2,123 mg	Au
XL.	0,0998 g	„	„	0,0640 g	Ag
XLI.	0,0938 g	„	„	0,0586 g	Ag
XLII.	0,1140 g	„	„	0,0742 g	Ag
XLIII.	0,1526 g	„	„	0,0201 g	K.W.
XLIV.	0,1126 g	„	„	0,0145 g	K.W.
XLV.	0,1314 g	„	„	0,0438 g	ZnO
XLVI.	0,0976 g	„	„	0,0324 g	ZnO

Literatur.

1. Kutscher u. Otori: Ztrbl. f. Physiol. Bd. 18, 1904.
2. Zickgraf: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 41, S. 291, 1904.
3. Otori: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 42, S. 453, 1904.
4. Kutscher u. Schenk: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 44.
5. Bang: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 26, S. 133, 1898.
6. Watanabe: Journ. of biol. chem. Vol. 33, P 253, 1917.
   — Journ. of biol. chem. Vol. 34, P 65, 1918.
7. Frank, Nothmann u. Wagner: Kli. Wo., Nr. 45, 1926.
8. — Kli. Wo., S. 1996, 1928.
9. Santenoise, Verdiere, Vidacovitch: Presse Med. 1930, Nr. 23, 389.
   Santenoise: Compt. rend. Soc. Biol. 1930, 54, Nr. 22, 765.
   Santenoise, Verdiere, Vidacovitch: Compt. rend. Soc. biol. 1930, 104, Nr. 22, 770.
   Santenoise, Brieu, Fuchs, Vidacovitch: Presse med. 1932, Nr. 20, 383.
   Penau u. Santenoise: Presse Med. 1930, Nr. 67, 1126.
10. Villaret, Justin-Besançon, Cachera: Presse Med. 1929, Nr. 39 u. Nr. 104,
11. Gley u. Kistinios: Compt. rend Soc. Biol. 1929, 100, Nr. 2 12. 90. 971. 1929, 101, Nr. 21. 526. — Presse Med. 1929, Nr. 79, 1279.
    Vaquez, Gley, Kistinios: Compt. rend Soc. Biol. 1929, 100, Nr. 13, 1088.
12. Heideprim: Med. Kli., 1932, 301.
13. Zipf: Med. Kli., 1931, 264.
14. Kutscher u. Steudel: Ztschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel 10, 528.
15. Steudel: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 37, S. 217.
16. Kossel u. Groß: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 135.
17. Emich: Monatshefte f. Chemie, Bd. 12, S. 23, 1891.
18. Kutscher u. Otori: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 43.
19. siehe unter 4.
20. Sievers: Ztschr. f. Biol. Bd. 87, Heft 4, S. 319, 1928.
21. Wrede, Strack, Bornhofen: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 183, S. 123.
22. Flössner: Ztschr. f. Biol. Bd. 86, S. 1, 1927.
23. Lohmann: Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 215, 1907.
24. Smorodinzew: Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 80, 221.
25. Strack, Neubaur, Geisendörfer: Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 220, S. 217, 1933.
26. Lohmann: Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 215, 1907.
27. Mott u. Halliburten: Philos. Trans. of the Royal Society Bd. 191, 1899.
28. Gautrelet: Compt. rend. Soc. Biol. Tome 148, P. 995—996 1909; 65, 73, 75. Tome 149, P. 149—150, 1909, 65.

29. Oppenheimer: Grundriß der Physiologie S. 27.
30. Ackermann: Ztschr. f. Biol. Bd. 74, S. 67, 1921.
31. Ackermann u. Kutscher: Ztschr. f. Untersuchung der Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 180; Bd. 14, S. 687.
32. Kutscher: Ztschr. f. Biol. Bd. 64, S. 240, 1914.
Kutscher u. Ackermann: Annual. Review of Biolchemistry, Vol. II. 356, 1933.
33. Suwa: Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. 128, 421; Bd. 129, 231.
34. Bebeschin: Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 72, S. 380.
35. Kohlrausch: Ztschr. f. Biol., Bd. 57, 1911.
36. Schreiner: Liebigs Annal. d. Chemie, Bd. 194, S. 68.
37. Wrede: Ztschr. f. physiol. Chemie ,Bd. 153, S. 291.

Lebenslauf.

Am 21. November 1907 als 8. Kind unter 6 Söhnen und 3 Töchtern des Baumeisters Johann Wilhelm Spahr und seiner Frau Emma geb. Lanz geboren, wuchs ich, Wilhelm Spahr, in meiner Geburtsstadt Marburg auf. Nach 3jährigem Besuch der Volksschule trat ich Ostern 1917 in die Sexta der Oberrealschule meiner Heimatstadt ein. An dieser Anstalt legte ich im Februar 1927 die Reifeprüfung ab, um mich dem Studium der Medizin zu widmen.

Zunächst studierte ich 7 Semester in Marburg, wo ich nach dem 5. Semester das Physikum bestand; darauf ein Semester in München. Zum S.S. 1931 kehrte ich nach Marburg zurück, wo ich am 27. Januar 1933 die ärztliche Staatsprüfung beendete.

Die erste Hälfte des Praktischen Jahres erledigte ich an der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts in Marburg bei Herrn Professor Dr. med. et phil. h. c. Fr. Kutscher, woselbst ich bereits während der letzten 3 Jahre meines Studiums wissenschaftlich gearbeitet hatte. Die zweite Hälfte arbeitete ich an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik bei Herrn Professor Dr. med. F. Klewitz.

Am 1. März 1934 wurde mir die ärztliche Approbation erteilt. Von da ab war ich im Physiologischen Institut als Assistent tätig.

Meine akademischen Lehrer in Marburg und München waren:

Alverdes, v. Auwers, Baur, Boeminghaus, Brock, Claussen, Dittler, Döderlein, Eimer, Flößner, Freudenberg, Geßner, Göppert, Grüneisen, Grüter, Hildebrand, Jaeck, Jakobshagen, Kehrer, Klapp, Klewitz, Korschelt, Kretschmer, Kutscher, Lexer, Mauz, Nauck, Naujoks, Neumann, Pfannenstiel, v. Pfaundler, v. Romberg, Ruete, Sänger, Schenk, Schwenkenbecher, Strecker, Uffenorde, Versé, Wessely, Wiedhopf, v. Zumbusch.

Marburg/Lahn, im September 1934.

Wilhelm Spahr.